



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**REPRODUCCIÓN MASIVA DE *Pinguicula  
acuminata* Benth MEDIANTE CULTIVO *IN  
VITRO* EN MEDIO LÍQUIDO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**Alfredo González Serratos**

**Director de tesis:**

**Dr. Juan Gerardo Ortíz Montiel**



**Los Reyes, Iztacala, Estado de México, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*«Creo que he oído atentamente y sopesado bien las pruebas de ambas partes, y me mantengo como un no creyente absoluto de casi todo lo que consideras las verdades más sagradas. Puedo ver mucho de admirable en todas las religiones, pero sobre si hay un Dios y cuál sea su naturaleza; sobre si tenemos un alma inmortal o no, o cuál sea nuestro estado tras la muerte, no puedo tener miedo de tener que sufrir por el estudio de la naturaleza y la búsqueda de la verdad».*

*- Alfred Russel Wallace*

*Dedicatoria:*

*A los futuros investigadores de mi amada Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

*A mis padres, por haberme inculcado que las verdades absolutas no existen, e ir tras la verdad; así como el amor y respeto por todos los seres vivos, así como las herramientas que permitieron mi desarrollo profesional y las bases de una libertad en la construcción del conocimiento propio sin la crítica de una duda en la superación personal.*

*A Elizabeth Rojas Iniestra por romper los paradigmas existenciales que había en mi Ser, ser mi más fiel colega en el camino de las Ciencias Médico – Biológicas, mi punto de apoyo emocional y mi pieza favorita del tablero para tomar con mayor sabiduría mis decisiones futuras.*

*A mis seres queridos que se han adelantado y espero alegrar cuando los encuentre en materia y energía.*

## AGRADECIMIENTOS

### *Institucionales:*

A la UNAM por abrirme las puertas hacia el gran conocimiento dentro de cada una de sus paredes.

A mi segunda casa la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por haberme hecho crecer profesional, moral y culturalmente durante mi estancia en ella.

Al Dr. Juan Gerardo Ortíz Montiel por aceptarme en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales como su alumno, brindarme toda la capacitación para el desarrollo teórico y práctico en la aplicación de las técnicas Biotecnológicas. Su paciencia, interés, apoyo y asesoría en mi proyecto hasta su culminación.

A mis revisores de tesis, la Biol. Yolanda Pozos Ruiz, la M. en C. María del Rocío Reyero Saavedra, el Dr. Oswaldo Valdés López, a la M. en C. Antonia Trujillo Hernández por sus valiosas correcciones y aportaciones al proyecto.

### *Personales:*

A mi primo Christopher Rodríguez Serratos por la motivación de la constante superación en cuestión profesional y su apoyo de hermandad.

A mis compañeros de laboratorio por las experiencias y conocimiento compartidos, intercambios de conocimiento, buenos momentos, apoyo en cuestiones técnicas y académicas.

A mis amigos cultivadores del género *Pinguicula* que me fomentaron el gusto y preservación de éstas especies, Rodrigo Patrón, Fabián Estrada, Juan Ignacio Tenorio, Claudio Castañón e Iván Zepeda.

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN .....	9
2.1 Plantas insectívoras.....	9
2.2 Familia Lentibulariaceae .....	10
2.2.1 El género <i>Pinguicula</i> .....	11
2.2.2 Mecanismos de insectivoría en <i>Pinguicula</i> .....	12
2.2.3 Hábitat y distribución de <i>Pinguicula acuminata</i> .....	13
2.3 Cultivo de tejidos vegetales.....	16
2.4 Reguladores de crecimiento vegetal .....	17
2.4.1 Auxinas .....	17
2.4.2 Citocininas .....	18
2.4.3 Acción sinérgica Auxina - Citocinina.....	18
3. ANTECEDENTES.....	19
3.1 Micropropagación de plantas insectívoras .....	19
3.2 Micropropagación en medios líquidos .....	21
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 Material biológico y establecimiento in vitro .....	23
6.2 Tratamientos.....	23
6.3 Regeneración y aclimatización .....	24
7. RESULTADOS .....	25
7.1 Propagación de <i>Pinguicula acuminata</i> y oxidación.....	25
7.2 Caracterización morfológica del tejido obtenido .....	29
7.3 Regeneración.....	30
7.4 Aclimatización .....	31
8. DISCUSIÓN.....	32
8.1 Crecimiento <i>in vitro</i> en medio líquido y sólido.....	32
8.2 Oxidación <i>in vitro</i> en medio líquido y sólido.....	34
8.3 Efecto de los reguladores de crecimiento .....	34
8.4 Proliferación .....	35
9. CONCLUSIONES .....	35

<b>10. Literatura citada</b> .....	36
<b>ANEXO</b> .....	41

## ABREVIATURAS:

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANA: Ácido Naftalenacético

BAP: 6-Bencil aminopurina

MS: Murashige Skoog

T1: Tratamiento 1 (0.5 / 0, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T2: Tratamiento 2 (1 / 0, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T3: Tratamiento 3 (2 / 0, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T4: Tratamiento 4 (0.5 / 0.2, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T5: Tratamiento 5 (1 / 0.2, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T6: Tratamiento 6 (2 / 0.2, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T7: Tratamiento 7 (0.5 / 0.5, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T8: Tratamiento 8 (1 / 0.5, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T9: Tratamiento 9 (2 / 0.5, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T10: Tratamiento 10 (2 / 1, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T11: Tratamiento 11 (5 / 2, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

T50: Tratamiento con 50 mL (0.5 / 0.5, ANA / B AP mg  $L^{-1}$ )

T25: Tratamiento con 25 mL (0.5 / 0.5, ANA / BAP mg  $L^{-1}$ )

## 1. RESUMEN

México posee una gran variedad de especies vegetales, más de 23,000 especies sólo de plantas vasculares en la flora de México, y cerca del 10% pertenecen al grupo de plantas insectívoras reportadas mundialmente. En particular el género *Pinguicula* de la familia Lentibulariaceae, está compuesto por 99 especies descritas en el mundo hasta el momento, de las cuáles 49 crecen en México y pertenecen al grupo de plantas insectívoras, ya que atraen, capturan y digieren insectos para obtener principalmente nitrógeno y otros elementos para su desarrollo. El conocimiento sobre éstas especies se encuentra disperso, y sólo comprenden una parte de las especies de ésta familia en México, esto no ha permitido determinar si ecológicamente se encuentran en alguna categoría de vulnerabilidad, haciendo necesario encontrar nuevas estrategias que permitan la preservación de éstas especies; por ejemplo el cultivo de tejidos vegetales es la técnica más apropiada para la propagación exitosa de *P. acuminata*, y en este trabajo se demostró con su cultivo bajo agitación constante en medio líquido Murashige y Skoog (1962) adicionado con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de Sacarosa,  $7 \text{ g L}^{-1}$  de agar y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Tiamina, pH 5.7, lo que permitió obtener un incremento promedio de 74 veces más tejido (41g de peso fresco), partiendo de 560 mg del explante, el cual consistió en brotes con una proliferación constante además de contener pequeños callos fácilmente disgregables.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Plantas insectívoras

Las Plantas insectívoras son un grupo diferente dentro de los vegetales, por que obtienen parte o la mayoría de sus necesidades nutricionales mediante la atracción, captura y consumo de animales, normalmente insectos, además de otros artrópodos (Brewer *et al.*, 2011). También se les denomina plantas carnívoras porque algunos géneros de éstas plantas pueden capturar y digerir vertebrados pequeños; pero la energía al igual que cualquier otra planta, la obtienen a través de la fotosíntesis.

Hablando de insectivoría, es una característica que ha evolucionado y se ha diversificado varias veces de manera independiente dentro de las angiospermas, y se debe a que habitan en ambientes limitados por bajos recursos en el suelo, sobre todo Nitrógeno y Fósforo, lo cual las llevó a tener ciertas modificaciones para adaptarse. Algunas de las características morfológicas que definen a la mayoría de las plantas insectívoras son: un sistema radicular pequeño, menor capacidad fotosintética, menor eficiencia en el uso de Nitrógeno y menor competitividad en comparación por las especies no insectívoras (Brewer *et al.*, 2011).

Existen cerca de 600 especies, donde cada una tiene diferentes formas en las que capturan a los insectos; se describen cinco tipos de trampas propuestas por Slack y Gate (1980):

- Trampas en forma de lámina ó tubo, adhesivas, en los géneros *Byblis*, *Drosera*, *Drosophyllum*, *Pinguicula* y *Triphiophyllum*, las cuales producen un mucílago pegajoso.
- Trampas en forma de bisagra, en los géneros *Aldrovanda* y *Dionaea*, con rápidos movimientos en sus hojas que encierran a sus presas.
- Trampas en forma de jarro, como *Cephalotus*, *Darlingtonia*, *Heliampora*, *Nepenthes* y *Sarracenia*, que ahogan a los insectos en un líquido con enzimas digestivas y bacterias que los degradan.

- Trampas de nasa o campana en *Genlisea* y *Sarracenia psittacina*, que consiste en un cilindro que se va estrechando, donde los insectos entran y por medio de tricomas son dirigidos hacia los órganos digestivos de la planta, de modo que el insecto ya no pueda regresar.
- Trampas de succión en *Utricularia*, las cuáles consisten en utrículos con forma de vejiga que atrapan al insecto por medio de un vacío interno.

## 2.2 Familia Lentibulariaceae

Familia de plantas insectívoras, de amplia distribución mundial, más de 300 especies descritas. Plantas herbáceas anuales o perennes; terrestres, acuáticas y a veces epífitas. Compuesta por tres géneros (ilustradas en Fig. 1): *Utricularia* con 220 especies, es el género con los órganos más complejos, *Pinguicula* con 99 especies y *Genlisea* con 21 especies. En México se encuentran representados los tres géneros, *Pinguicula* con 49 especies (Zamudio, 2005 b; Gutiérrez 2005; Rivadavia *et al.*, 2017 y Zamudio *et al.*, 2018), *Utricularia* con 20 especies (Zamudio y Olvera, 2009) y *Genlisea* con una especie (Olvera y Martínez, 2002).

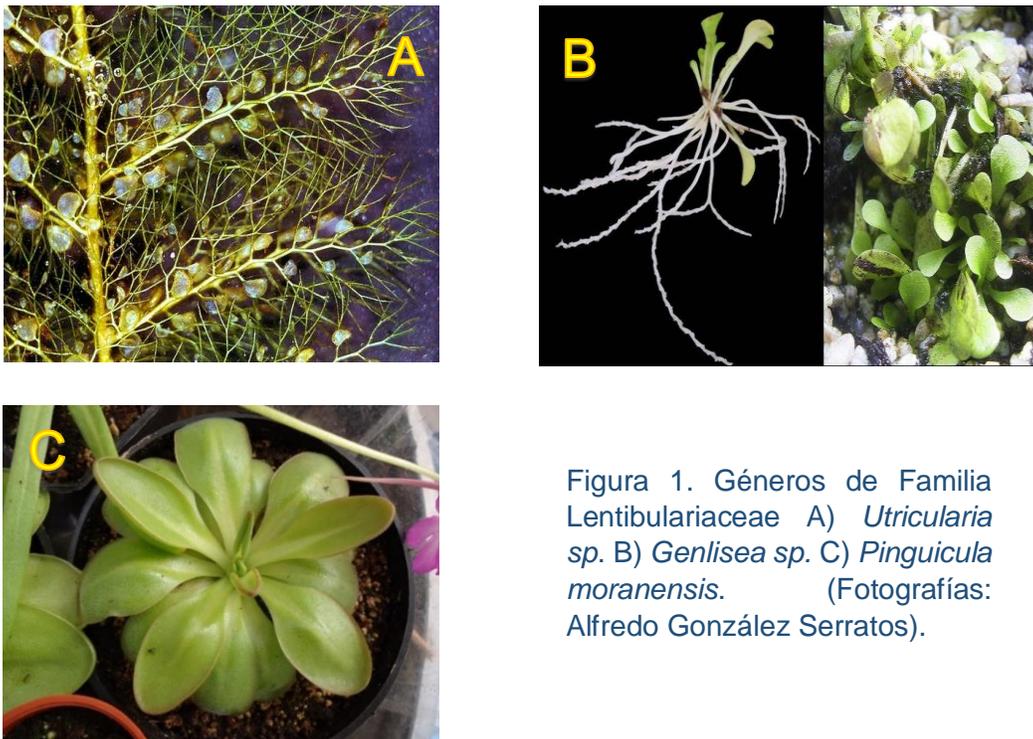


Figura 1. Géneros de Familia Lentibulariaceae A) *Utricularia* sp. B) *Genlisea* sp. C) *Pinguicula moranensis*. (Fotografías: Alfredo González Serratos).

En nuestro país, el conocimiento sobre la familia Lentilulariaceae se encuentra disperso en floras ó listados florísticos regionales, los que sólo comprenden una parte de las especies de ésta familia en México (González Morales *et al.*, 2015).

### 2.2.1 El género *Pinguicula*

El género está compuesto por 99 especies descritas hasta el momento (Zamudio, 2005 b; Gutiérrez 2005; Rivadavia *et al.*, 2017 y Zamudio *et al.*, 2018). Distribuidas, principalmente, en las regiones templadas del Hemisferio Norte del mundo, con algunos representantes en las Antillas y en los Andes sudamericanos (Zamudio, 2005a). Cada planta consta de un rizoma simple, corto, raíces adventicias filiformes; hojas enteras, dispuestas en una roseta basal, con frecuencia dimórficas (Fig. 2), diferenciándose en rosetas de “invierno” con hojas pequeñas, carnosas y compactas y de “verano” con hojas laxas, membranáceas y glandulares.

Crece en suelos húmedos, generalmente con pH ácido, como los encontrados en pantanos; o bien en suelos alcalinos encontrados cerca de cuerpos de agua, protegidas de la luz directa del sol. Pueden encontrarse también como plantas epífitas sobre troncos de árboles colonizados por musgos, al igual que sobre laderas totalmente verticales de roca con musgo (Legendre, 2000). Éstas condiciones contrastantes pueden condicionar la ecología de las poblaciones situadas en distintas exposiciones ya que, incluso a una escala espacial reducida, la heterogeneidad ambiental provoca diferenciación morfológica y fisiológica en plantas, condicionando tanto su fenología, estructura demográfica de las poblaciones y evolución (Zamora, 2002).





Figura 2. Tipos de roseta (A) Roseta de invierno de *Pinguicula jaumavensis* y (B) una roseta de verano de *Pinguicula moranensis*, especies heterófilas, (C) *Pinguicula primuliflora*, una especie homófila donde su roseta no cambia durante el año. (Fotografías: Alfredo González Serratos).

### 2.2.2 Mecanismos de insectivoría en *Pinguicula*

La insectivoría está fuertemente relacionada a la presencia de dos tipos de glándulas (Fig. 3): sésiles y pedunculadas en la superficie adaxial de sus hojas. Las glándulas pedunculadas secretan mucilago pegajoso que es el responsable de atrapar a la presa, dejándolas inmóviles hasta ahogarlas en el líquido y tienen un papel mínimo en la digestión, que es llevada a cabo por las glándulas sésiles.

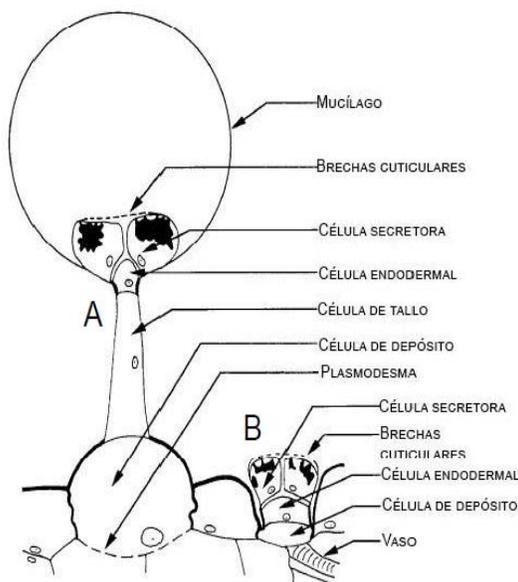


Figura 3. Estructura de glándula pedunculada (A) y sésil (B). Tomado y modificado de Legendre 2000.

Se sugirió que en la superficie de las hojas de *Pinguicula*, el brillo que adquieren las gotas de mucilago en sus glándulas por la incidencia de la luz, provoca la atracción de los insectos, y que sólo quedarían atrapados pequeños insectos voladores como áfidos, los cuáles el tamaño de sus patas no sea 3 a 5 veces mayor que el tamaño de las glándulas pedunculadas, de otra forma algún insecto con patas más grandes podría escapar (Legendre, 2000).

Estas dos glándulas provienen del mismo tejido epidérmico y difieren una de la otra en cuanto al tamaño y número de células que las componen, las glándulas pedunculadas tienen desde ocho a treinta y dos células, mientras que las sésiles están solamente conformadas por cuatro a ocho. El número de glándulas varía relativamente entre especies, en la mayoría sólo están presentes en la parte superior adaxial de las hojas, pero en varias otras especies también están presentes en los escapos florales y en muy pocos casos como *Pinguicula primuliflora* y *P. gigantea* presenta glándulas pedunculadas en la parte inferior abaxial de las hojas. (Legendre, 2000).

Una vez que el insecto es capturado, es bañado en una pequeña secreción de enzimas digestivas que producen las glándulas sésiles (Fig. 4). Este proceso no ocurre en toda la hoja, solamente en el lugar donde el insecto fue capturado.



Figura 4. Insectos atrapados e inmovilizados en hojas de *Pinguicula moranensis*. (Fotografía: Alfredo González Serratos).

### 2.2.3 Hábitat y distribución de *Pinguicula acuminata*

En México crecen 49 especies del género *Pinguicula* de las cuales el 87% son endémicas de este país (Zamudio, 2005 b; Gutiérrez 2005; Rivadavia *et al.*, 2017 y Zamudio *et al.*, 2018). Entre las especies endémicas se encuentra *Pinguicula acuminata*, esta especie habita en bosques de encino, pino-encino o de oyamel, en el sur de Querétaro, norte de Michoacán y el Parque Nacional el Chico en el estado

de Hidalgo (Fig. 5), crece en laderas de rocas ígneas sombreadas y húmedas, asociada con musgos, helechos y plantas suculentas, a una altitud de 2300 a 2950 m.s.n.m (Fig. 6). La floración ocurre de febrero a mayo mientras presenta la roseta de “invierno”. La roseta de “verano” se desarrolla de julio a octubre.

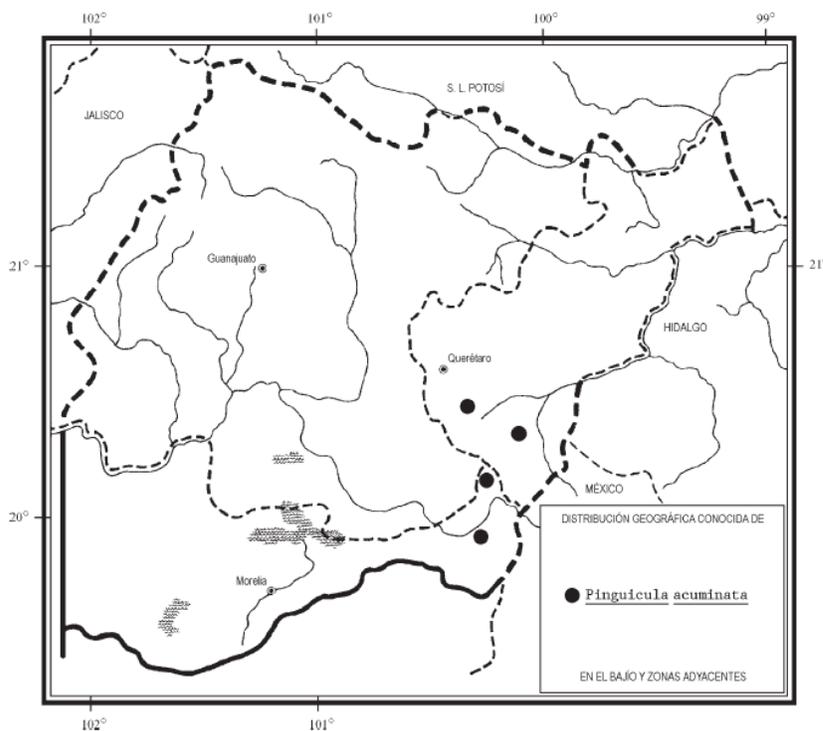


Figura 5. Distribución conocida de *Pinguicula acuminata* (tomado de Zamudio 2005a).

#### 2.2.4 Fenología de *Pinguicula acuminata*

Planta herbácea perenne; heterófila, roseta “invernal” hipógea, compacta en forma de bulbo, formada por 30 a 40 hojas carnosas, ovado-lanceoladas u oblongo-ovadas, de 10 a 20mm de largo, por 4 a 6 mm de ancho, ápice largamente acuminado; roseta de “verano” laxa, con 2 a 4 hojas membranáceas, largamente pecioladas, pecíolo de 12 a 57 mm de largo, cóncavo y piloso en la parte superior, lámina ampliamente ovada a suborbicular, de 22 a 92 mm de largo, por 16 a 83 mm de ancho, ápice obtuso, base redondeada o cordada, margen involuto; pedúnculos de 70 a 150 mm de largo, glandular-pubescentes cerca del ápice; flores de 10 a 22 mm de largo (incluyendo el espolón); cáliz bilabiado, lóbulos 7 lanceolados a oblongo-lanceolados, de 1.5 a 3 mm de largo, por 0.7 a 1.5 mm de ancho; corola subsoloba, el labio inferior un poco mayor que el superior, variando en color de

blanco a diversos tonos de violeta, lóbulos obovados a oblongo-subcuneados, de 5 a 12 mm de largo, por 2.5 a 10 mm de ancho, ápice redondeado a truncado, tubo subcilíndrico, de 6 a 8 mm de largo, fuertemente geniculado en la parte ventral, doblado en ángulo de 95 a 105° cerca de la mitad, con largos tricomas claviformes en la garganta y tres líneas de pelos claviformes por dentro, espolón cilíndrico, engrosándose hacia el ápice, recto o ligeramente curvo, de 2.5 a 5 mm de largo; cápsula globosa, de 3 a 4 mm de diámetro; semillas elipsoidales, de 0.9 a 1.1 mm de largo, por 0.2 a 0.3 mm de ancho, superficie reticulada.



Figura 6. Hábitats conocidos de *Pinguicula acuminata* (tomado de [http://www.pinguicula.org/pages/plantes/pinguicula\\_acuminata.htm](http://www.pinguicula.org/pages/plantes/pinguicula_acuminata.htm)).

### 2.3 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, se realiza bajo condiciones asépticas (libres de patógenos como: bacterias, hongos y virus) y controladas que permitan el desarrollo y crecimiento saludable de una planta. Involucra el uso de diferentes técnicas donde se utiliza material vegetal diverso, incluyendo semillas, ápices, protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas.

El principio de “Totipotencialidad celular” fue postulado por Haberlandt (1902), y establece que si a cualquier célula se le provee de las condiciones nutricionales adecuadas, será capaz de regenerar una planta completa.

La micropropagación permite la reproducción masiva de plantas en un tiempo relativamente corto (Pérez *et al.*, 2017); a este proceso se le atribuyen diversos usos para los cuáles será destinada ésta técnica, siendo los principales, la propagación de biomasa, conservación de germoplasma, producción de principios activos y manipulación genética, también para la comercialización, que es la parte más atractiva (Merkle *et al.*, 1990), la horticultura, entre otros.

Permitiendo también el uso de especies clonadas y no colectadas, resguardando así, la integridad de poblaciones naturales susceptibles a estar en alguna categoría de riesgo.

El crecimiento y desarrollo mediante las técnicas de cultivo *in vitro* puede ser dirigido en diferentes sentidos: la producción de callos (cúmulo de células desorganizadas y desdiferenciadas, obtenido de un determinado tejido, proliferando en la superficie de un cultivo sólido ó bien, creciendo en suspensión líquida bajo agitación constante), la producción de brotes de forma directa, la producción de embriones somáticos (pequeños embriones a partir de células somáticas sin la necesidad de que exista la fusión de gametos) directos sobre tejido, o la producción de embriones somáticos de células en suspensión.

En estos eventos morfogénicos, es posible inducir procesos de desdiferenciación y diferenciación en células o tejidos, donde se ven implicados factores genéticos,

fisiológicos y bioquímicos (Frías *et al.*, 2011). Los medios de cultivo nutritivos más usados son: medio Knutson C (1946), White (1963), Vacin y Went (1949), Murashige y Skoog (1962), entre otros. Este último medio es conocido como “MS” (por las iniciales de los investigadores); fue formulado por Toshio Murashige y Folke Skoog en 1962; adicionado con vitaminas, aminoácidos y sacarosa al medio de cultivo que constituye la fuente más utilizada y actúa como fuente energética y de carbono, e incrementa el potencial osmótico del medio, en concentraciones del 2 al 4 % (p/v). Finalmente los reguladores de crecimiento vegetal que son más usados principalmente, es el grupo de auxinas y citocininas.

## **2.4 Reguladores de crecimiento vegetal**

Reguladores del crecimiento vegetal, se les denomina así al conjunto de hormonas vegetales (aquellas que son producidas naturalmente), y a las sintéticas. Son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo en plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones, cercanas a 1 mM. También resultan útiles para la producción de metabolitos, entre las más reconocidas son auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (George *et al.*, 2008). En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos reguladores, principalmente auxinas y citocininas, puede inducir y fijar algún tipo de expresión morfológica dependiendo de la concentración relativa entre sí.

### **2.4.1 Auxinas**

Es una familia de sustancias químicas, sintetizadas en los tejidos vegetales jóvenes, como en embriones, las yemas de crecimiento, hojas y frutos. Las auxinas sintéticas tienen diversas aplicaciones dependiendo la concentración y explante usado, determinando la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*; también intervienen en el tropismo a la gravedad (gravitropismo) y a la luz (fototropismo), la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares. En el cultivo de tejidos, el uso de altas concentraciones, las auxinas pueden inducir la

embriogénesis somática (Evans *et al.*, 2003) ó resultar tóxicas y entonces pasarían a la categoría de herbicida, en gran parte por que estimulan la producción de etileno, el cual provoca la inhibición del crecimiento (Faccini and Puricelli, 2007).

Dentro del grupo de las auxinas sintéticas, las hay de naturaleza química muy variable: ácidos indólicos, ácidos naftalénicos, clorofenoxiácidos y derivados de los ácidos benzoico y picolínico. Entre las más usadas se encuentra el ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenacético) y el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

#### **2.4.2 Citocininas**

El nombre de citocininas se refiere a su papel en la división celular o citocinesis (división de la célula). Las citocininas son derivados de la adenina y se sintetizan de manera natural en zonas meristemáticas de la raíz y de embriones; se transportan a través del xilema hacia otros órganos de las plantas, donde en general propician un estado más juvenil de desarrollo, incrementando la tasa de división celular y el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos. También rompen la dominancia apical y contrarrestan la latencia de la semilla.

La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas (Haré y Staden 1997; Krikorian 1995).

#### **2.4.3 Acción sinérgica Auxina - Citocinina**

Algunos estudios han indicado que para la inducción del tejido calloso se ha empleado en el medio la combinación de la auxina ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenacético) y la citocinina BAP (6-Bencil aminopurina) en proporción 1:1, permitiendo que las células pasen a un estado indiferenciado (Krikorian 1995; Pérez *et al.*, 2017).

Se sabe que existe una proporción adecuada entre auxinas y citocininas que permite regular la organogénesis o la diferenciación (Krikorian, 1995), determinando así la cantidad de tejido desarrollado en peso fresco a partir del explante; esto se

atribuye de igual manera a la acción de la citocinina BAP en combinación con la auxina ANA, directamente en el ciclo celular. La acción sinérgica de ambos reguladores de crecimiento es fundamental, ya que BAP promueve dentro del ciclo celular, una nueva división por mitosis después de G2 (Haré y Staden 1997, Mironov *et al.*, 1999, Frank y Schmölling 1999).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Micropropagación de plantas insectívoras

De manera directa los siguientes autores han trabajado con el Género *Pinguicula*. Gonçalves *et al.* (2008) realizaron propagación *in vitro* de *Pinguicula lusitánica* a partir de semillas colectadas, desinfectadas y germinadas en medio Murashige & Skoog 1962 (MS)  $\frac{1}{4}$  de su concentración original, para medir la proliferación y enraizado; donde manipularon concentraciones de (0.1 y 0.5mg  $L^{-1}$ ) de BA, ZEA, KIN; NAA, IAA, IBA; con tres concentraciones de medio MS (1962), 100, 50 y 25%. Donde el mejor tratamiento fue MS  $\frac{1}{2}$  + 0.5 mg  $L^{-1}$  BA ó KIN obteniendo 29 veces más tejido luego de 8 semanas de cultivo.

Clapa *et al.* (2010) utilizaron roseta y esquejes de hoja de *Pinguicula vulgaris* que provenían de cultivos *in vitro* previos, usando medio con y sin reguladores de crecimiento. Para su experimento, usaron medio MS (1962) con tres variantes. Después de tres meses de cultivo, obtuvieron un mayor número de explantes de hoja (97.44%) con el medio MS + 0.1mg  $L^{-1}$  BAP.

También se ha propagado otra especie de este género con reguladores de crecimiento con el fin de encontrar el mejor medio para lograr una buena propagación (Kanjana *et al.*, 2011), mediante varios tratamientos, midieron los efectos de BA y ANA en la propagación de *Pinguicula gigantea*. Después de ocho semanas de cultivo obtuvieron que el mayor número de plántulas (21.75 brotes) se encontraba en el medio con MS (1962) + 2 mg  $L^{-1}$  BA y MS + 0.1 mg  $L^{-1}$  de ANA. Cabe resaltar que obtuvieron pequeños callos con la combinación de MS + 2 mg BAP  $L^{-1}$  con 5 mg ANA  $L^{-1}$ .

Por su parte Pérez *et al.* (2016) propagaron tres especies del género *Pinguicula*, utilizando material colectado de campo el cuál incluía hojas de *P. acuminata* y *P. crassifolia* y semillas para *P. moranensis*. Se sembraron en medio MS (1962)  $\frac{1}{4}$  con 20 g  $L^{-1}$  de sacarosa, 8.5 g  $L^{-1}$  de agar y pH 5.7, utilizando reguladores de crecimiento (ANA, BAP y 2, 4-D) para inducir la formación de callo. Obtuvieron un porcentaje bajo de sobrevivencia de los explantes de hoja de *P. acuminata* y *P. crassifolia* (31% y 8% respectivamente). Para el caso de *P. moranensis*, el medio MS  $\frac{1}{4}$  + 0.5 mg  $L^{-1}$  BAP, 0.5 mg  $L^{-1}$  ANA, permitió la inducción de 100% de callo, que se observó definido y friable.

Pérez *et al.* (2017) germinaron semillas de *Pinguicula moranensis* en medio MS (1962)  $\frac{1}{4}$ , con 100 mg  $L^{-1}$  de inositol, 0.4 mg  $L^{-1}$  de tiamina, 20 g  $L^{-1}$  de sacarosa, 8.5 g  $L^{-1}$  de agar y pH 5.7, sin reguladores de crecimiento, donde presentaron baja germinación (5%). De estas se seleccionaron plántulas de 10 días, se incubaron por 30 días en medio MS  $\frac{1}{4}$  + (0, 0.5 mg  $L^{-1}$  BAP) en combinación con (0, 0.5 mg  $L^{-1}$  ANA), ó (0, 1.0 mg  $L^{-1}$  2,4 D). La presencia de 2,4-D produjo necrosis en esta especie en todos los casos; sin embargo, el medio MS  $\frac{1}{4}$  + 0.5 mg  $L^{-1}$  BAP, 0.5 mg  $L^{-1}$  ANA, permitió la inducción de 100% de callo, que se observó definido y friable.

Algunas otras plantas insectívoras como las Droseras, se han cultivado *in vitro* con éxito con fines de investigación, principalmente de interés farmacológico, como es el caso de la obtención de metabolitos secundarios. Alvarado *et al.* (2010), para demostrar la actividad inhibitoria de plantas *in vitro* de *Drosera capillaris* sobre *Mycobacterium tuberculosis*, propagaron plantas de 10 – 12 meses de edad, donde se usaron pequeñas plántulas completas como explante en medio de cultivo MS (1962), con tiamina. HCl 1 mg  $L^{-1}$  y myo-inositol 100 mg  $L^{-1}$  y los reguladores de crecimiento ácido naftalenacético (ANA) y ácido giberélico (AG3) 0,02 mg  $L^{-1}$  respectivamente; luego de 10 – 12 meses de cultivo, obtuvieron plantas de 3 – 5 cm de altura con 5 – 10 brotes por explante.

Perica y Berljak (1996) cultivaron *Drosera spatulata* en medio MS (1962) con y sin reguladores, siendo que el mejor tratamiento fue MS 100% sin reguladores, donde obtuvieron de 100 – 200 plantas por explante.

### 3.2 Micropropagación en medios líquidos

Por otro lado en cuánto al cultivo en medio líquido, Quiala *et al.*, (2011), colectaron brotes apicales en un invernadero de *Tectona grandis*, los cuáles fueron desinfectados y cultivados en medio MS (1962) con 2.2  $\mu\text{M}$  de BA, 20 g  $L^{-1}$  de sacarosa, 2.5 g  $L^{-1}$  de Gelrite (sólido), pH 5.8, 16 h de luz, a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Se subcultivaron cada 30 días en el mismo medio pero con 4.44  $\mu\text{M}$  de BA. El octavo subcultivo se realizó en medio MS (1962) líquido, sin reguladores y con tres concentraciones de BA (2.22, 4.44 y 6.66  $\mu\text{M}$  respectivamente), programado para la inmersión del tejido durante 40 segundos cada 6 horas por 4 semanas. Pasado este tiempo, el mayor número de brotes encontrados (10.3 brotes con nodo y hojas sin raíz por explante) fue en el medio MS (1962) + 6.66  $\mu\text{M}$  de BA, mientras que el 100% enraizaron en medio sin hormonas.

Se llevó a cabo un estudio por Mbiyu *et al.* (2012) para comparar los efectos del medio sólido y medio líquido sobre el desarrollo de tres variedades de papa en Kenia. El medio líquido consistió en MS (1962) adicionado con aminoácidos, vitaminas y sacarosa, mientras que el medio sólido fue la misma fórmula pero adicionando el gelificante phytigel. Los datos tomados fueron número de raíces, nodos y hojas por planta luego de cuarenta días de cultivo. Se encontró que el medio líquido induce más raíces, más nodos y más hojas en las plántulas que el medio sólido. Además, concluyeron que es más económico usar medios líquidos que medios sólidos para papa en micropropagación in vitro.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Existen varias poblaciones de *Pinguiculas* en México, pero no existen estudios suficientes para determinar si ecológicamente se encuentran en alguna categoría de vulnerabilidad (Zamudio y Ortega, 1994). Esto hace necesario elaborar estrategias alternativas para la preservación de éstas especies mediante distintas vías, siendo el cultivo de tejidos vegetales la técnica idónea para la propagación con éxito de distintas especies vegetales con alguna condición que limite su reproducción. En este caso, se ha cultivado *P. acuminata in vitro* a partir de esquejes de hoja de roseta de invierno, pero su establecimiento tuvo un bajo porcentaje de sobrevivencia. Por lo que en este trabajo se evaluaron diferentes medios de cultivo *in vitro* para que permitiera la activa reproducción de *P. acuminata*.

#### 5. OBJETIVOS

##### General:

- Establecer y caracterizar el desarrollo *in vitro* de brotes de *Pinguicula acuminata* creciendo en medio líquido.

##### Particulares:

- Determinar que tratamiento en medio de cultivo MS (1962) con los reguladores BAP en combinación con ANA ó 2, 4-D, permite una activa reproducción de *P. acuminata* creciendo en medio sólido.
- Describir la reproducción de *P. acuminata* creciendo en dos cantidades diferentes del medio seleccionado pero líquido.
- Caracterizar el desarrollo de *P. acuminata* en el medio líquido.
- Recuperar plantas de forma independiente cultivadas en medio sólido sin hormonas.
- Evaluar su aclimatización.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico y establecimiento *in vitro*

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, donde se multiplicaron brotes de *P. acuminata* a partir de plántulas *in vitro* sin reguladores de crecimiento existentes en el laboratorio, las cuáles fueron colectadas en roseta de invierno en la presa “El Cedral” dentro del Parque Nacional “El Chico”, Hidalgo, Méx. 20°12'26"N 98°43'52"O (Pérez *et al.* 2016).

Se seleccionaron y se utilizaron como explantes tres plántulas al azar, considerando que la cantidad de tejido fuera la misma por cada frasco cilíndrico de fondo plano con una capacidad de 100 mL (frascos de cultivo), usando medio MS (1962) diluido a  $\frac{1}{4}$  de su concentración original, adicionado con 30 g  $L^{-1}$  de Sacarosa, 7 g  $L^{-1}$  de agar y 1 mg  $L^{-1}$  de Tiamina y combinaciones de BAP con ANA ó 2,4 D indicados en la Tabla 1, el pH se ajustó a 5.7 y se esterilizo en autoclave a una presión de 121°C y 1.05 Kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min.

### 6.2 Tratamientos

La siembra en medio sólido se realizó con 5 repeticiones (n=5, frasco de cultivo) para cada tratamiento (Tabla 1) y se mantuvieron los frascos bajo las condiciones ambientales de 22-25 °C, con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad con una radiación fotosintéticamente activa de 120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a partir de tubos fluorescentes blanco frío, durante 8 semanas; cabe mencionar que fue necesario realizar subcultivos periódicos cada mes para el mantenimiento *in vitro* de esta especie. Posteriormente se evaluó la respuesta morfológica del tejido vegetal tomando en cuenta el peso fresco y proliferación, con ésto se hizo la elección para el cultivo en medio líquido.

Pasado las ocho semanas después del cultivo en medio sólido, se utilizó aproximadamente 560 mg del explante proveniente del tratamiento que presentó mayor reproducción, con pequeños callos fácilmente disgregables para el

establecimiento en medio líquido el cual consistió en grupos de brotes múltiples (a los cuáles en adelante llamaremos “bloques”), que se obtuvieron en el medio MS  $\frac{1}{4}$  + 0.5 mg  $L^{-1}$  ANA + 0.5 mg  $L^{-1}$  BAP adicionado con 30 g  $L^{-1}$  de Sacarosa, 7 g  $L^{-1}$  de agar y 1 mg  $L^{-1}$  de Tiamina, pH 5.7 . Se sembró un bloque por cada matraz de 250 mL (Fig. 9), dividido en: un tratamiento con un volumen de medio de 50 mL (T50) (n=6, cada matraz) y un tratamiento con 25 mL (T25) (n=3, cada matraz) de medio líquido con la concentración 0.5 mg  $L^{-1}$  ANA + 0.5 mg  $L^{-1}$  BAP, y se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm bajo las mismas condiciones ambientales que el medio sólido, pero durante 60 días. Durante este tiempo, se registró el peso fresco del contenido de cada matraz en condiciones estériles cada 15 días, y se caracterizó el desarrollo de los explantes con base en los siguientes criterios: disgregabilidad, dureza y grado de diferenciación. Con los datos obtenidos se hizo una curva de crecimiento.

Para tratar la oxidación presentada, se enjuagó con agua destilada estéril y se realizó el cambio por medio fresco, por primera y segunda vez a los quince días, el tercero y cuarto a los siete días por tratamiento.

### **6.3 Regeneración y aclimatización**

Después de 60 días en agitación y cultivo en medio líquido, los bloques de brotes obtenidos se pasaron a frascos de cultivo con medio MS  $\frac{1}{4}$  adicionado con 30 g  $L^{-1}$  de Sacarosa, 7 g  $L^{-1}$  de agar y 1 mg  $L^{-1}$  de Tiamina, pH 5.7, sin reguladores de crecimiento, para dar paso a la regeneración en plántulas independientes. Posteriormente a las 8 semanas de la resiembra, se cuantificó el número de brotes por frasco y se describió la respuesta morfológica.

Cuando las plantas que se regeneraron individualmente alcanzaron un tamaño de entre 0.5 - 0.8 cm de diámetro, se aclimatizó un total de 68 plantas en una mezcla de peat moss/perlita (también llamada agrolita) (2:1).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Propagación de *Pinguicula acuminata* y oxidación

El tejido sembrado en medio sólido T7 (Tabla 1) el cuál contenía ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) de ANA y BAP respectivamente, contenía pequeños callos fácilmente disgregables, así como bloques de brotes con una constante proliferación (Fig. 7). Ésta fue la respuesta más favorable para iniciar el establecimiento en medio líquido, debido a que incrementó su peso fresco en promedio de 6.3 g, el tejido se mostró suave, color verde, sin estructuras definidas y organizadas, mientras que en otros tratamientos se podía obtener pequeñas plántulas etioladas, filiformes, con formación de raíz e incluso vitrificadas.



Figura 7. Bloques de brotes múltiples creciendo en medio MS  $\frac{1}{4}$  con la combinación de reguladores  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  ANA y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP.

Los tratamientos que limitan la viabilidad en esta especie, incluye la aplicación de 2,4 D, bajo cualquier concentración a la que fueron sometidas, murieron luego de 7 – 10 días de cultivo.

Respecto al medio líquido, los resultados en cuanto a cantidad de peso fresco, estado fisiológico y rendimiento del medio, para el T50, tuvo un incremento promedio de 41 g (74 veces más tejido) (Fig.8), el tejido se muestra vitrificado y con poca oxidación durante los 60 días de cultivo (Fig. 12, 13 y 14).

Mientras que para T25, se obtiene una reproducción de 14g (25 veces más tejido), desprendimiento de materia celular muerta y abundante oxidación del medio de cultivo (Fig. 11-13).

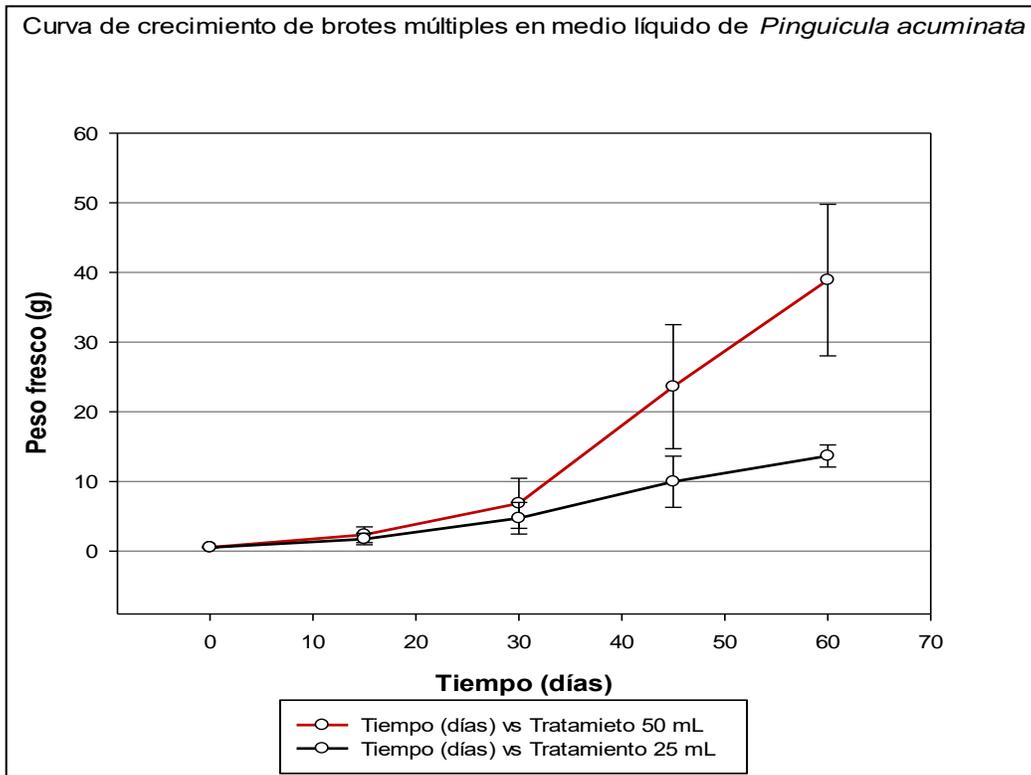


Figura 8. Peso en gramos de tejido desarrollado, se muestran los promedios de T50 (n=6) y T25 (n=3),  $\pm$  error estándar.



Figura 9. Establecimiento del cultivo en medio líquido, T50 y T25 al tiempo cero.

A los quince días, ambos tratamientos presentaban leve oxidación y no se observa diferencia en el incremento de biomasa (Fig. 10).

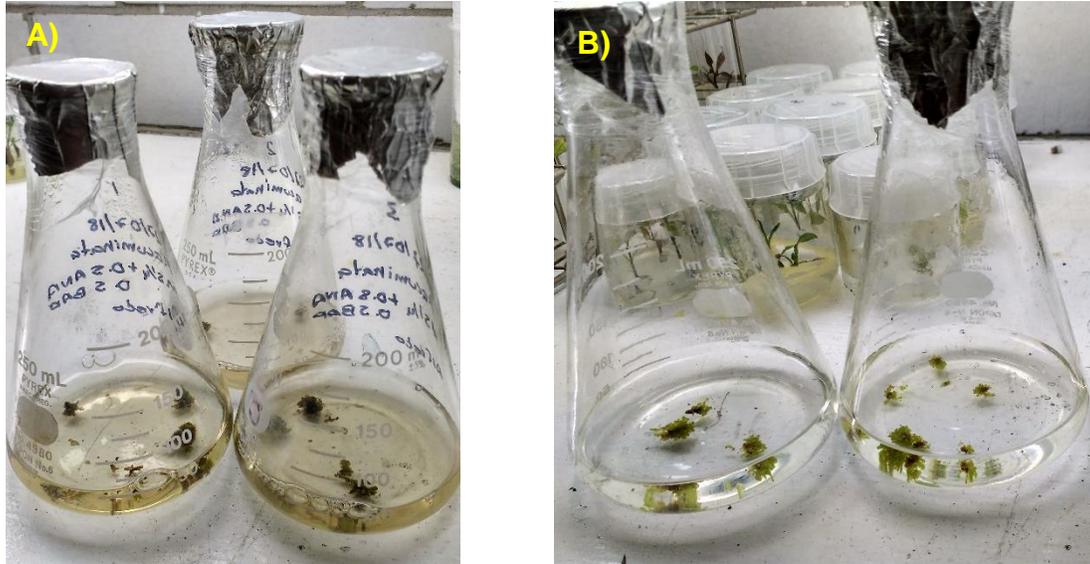


Figura 10. Establecimiento del cultivo en medio líquido, día quince.

A) Antes del cambio de medio, B) después del cambio de medio.

A partir de los treinta días de cultivo, se puede determinar que el T50 fue el más eficiente en cuanto a la cantidad de tejido producido, menor cantidad de oxidación y menor cantidad de materia orgánica muerta (Fig. 11).

De manera opuesta, en el T25 se observó mayor cantidad de materia orgánica pegada a las paredes del matraz, se sospechó que podía tratarse de pequeños agregados celulares desprendidos, que pudieran ser una fuente alternativa para ser usada como explante en futuras resiembras, por lo que se realizó la extracción de la parte líquida (1 mL) con una pipeta estéril de boca ancha y se transfirió a nuevos matraces ( $n=5$ ) con 25 mL del mismo medio líquido, en los que permanecieron durante 8 semanas. Sin embargo, no hubo ninguna señal de proliferación ni de oxidación, por lo que no se considera viable de propagar por esta vía.

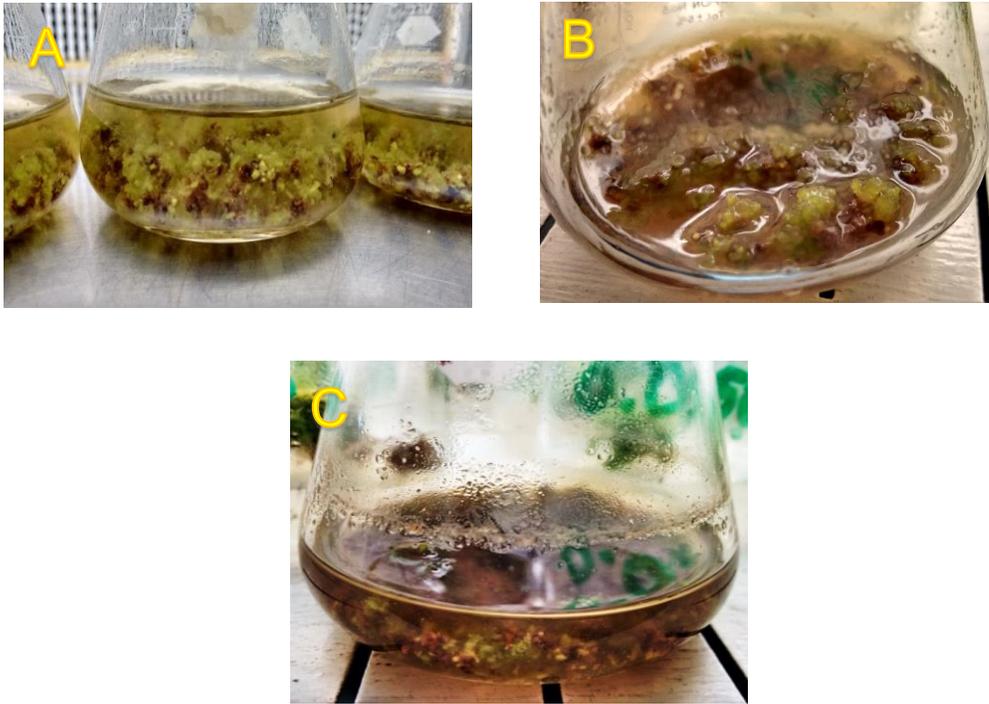


Figura 11. Establecimiento del cultivo en medio líquido, día treinta. A) T50, B) y C) T25, se observa materia orgánica en las paredes de los matraces.

A los sesenta días de cultivo, se aprecia notablemente la diferencia entre los tratamientos (Fig. 12), siendo inferior el desarrollo en cuanto a cantidad de tejido desarrollado en el T25 incluyendo un alto grado de oxidación y la consecutiva muerte de estos brotes; por el contrario fue muy vigoroso el desarrollo de los brotes establecidos en T50 con mínima oxidación.

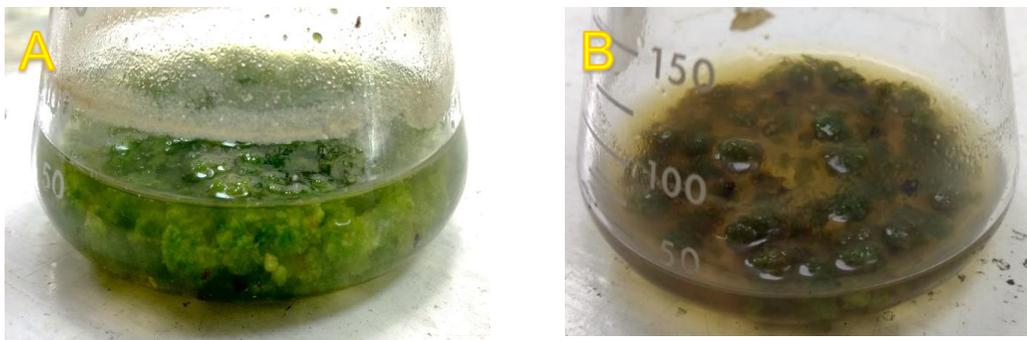


Figura 12. Establecimiento del cultivo en medio líquido, día cuarenta y cinco. A) T50, B) T25.

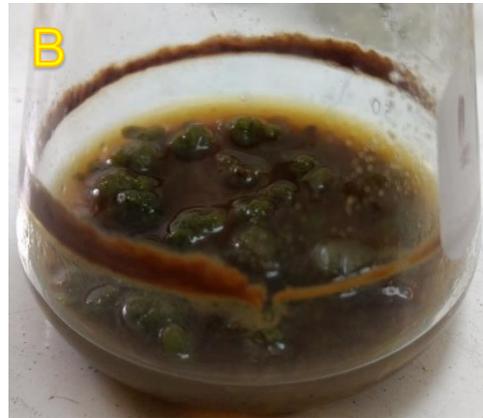
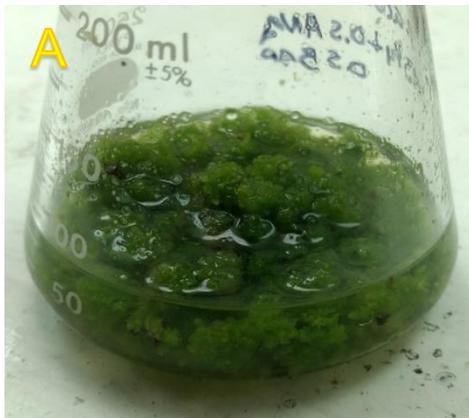


Figura 13. Establecimiento del cultivo en medio líquido, día sesenta.

A) T50 y B) T25

En semanas anteriores, no se notaban estructuras bien definidas, a diferencia de como se notan a los setenta días bajo cultivo (Fig. 14). También se observa saturación causada por falta de movimiento y libertad de rotación de esos bloques de brotes que se mantenía en estrecha unión.



Figura 14. Establecimiento del cultivo en medio líquido, T50, día setenta.

## 7.2 Caracterización morfológica del tejido obtenido

Se presentan las características de los bloques de brotes a los sesenta días de cultivo (Fig.15). No son fácilmente separables en este momento, lo que dificulta medir por separado los brotes, el bloque es de consistencia dura, no hay aparente definición de estructuras organizadas y no existe autonomía con el tejido generador.



Figura 15. Bloques de brotes múltiples a los sesenta días en el T50, se muestra el tamaño aproximado.

### 7.3 Regeneración

Se muestran las plántulas establecidas en medio sólido y sin reguladores, las cuáles a partir de las 8 semanas han logrado rediferenciarse exitosamente (Fig. 16). Cabe mencionar que los explantes usados continuaron proliferando, generando nuevos brotes basales, los cuáles se subcultivaron mensualmente.

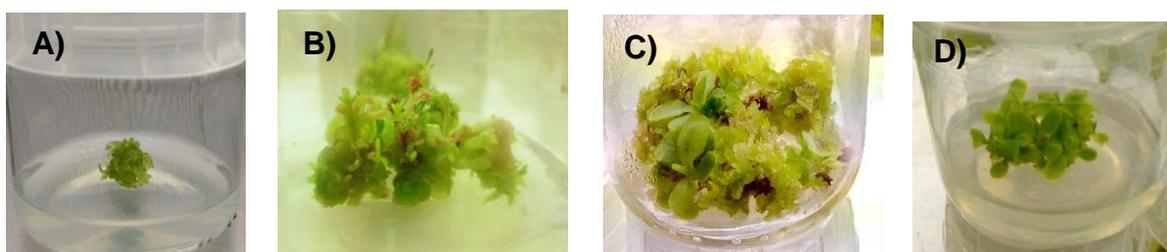


Figura 16. Plántulas de *P. acuminata* A) 15 días, B) 45 días, C) 60 días y d) 90 días de cultivo en medio MS ¼ sin reguladores de crecimiento.

Se realizó una cuantificación de  $1248 \pm 5.96$  brotes existentes en 16 bloques de brotes que contenía un frasco, a las 8 semanas de estar en medio sólido sin reguladores (Fig. 17).

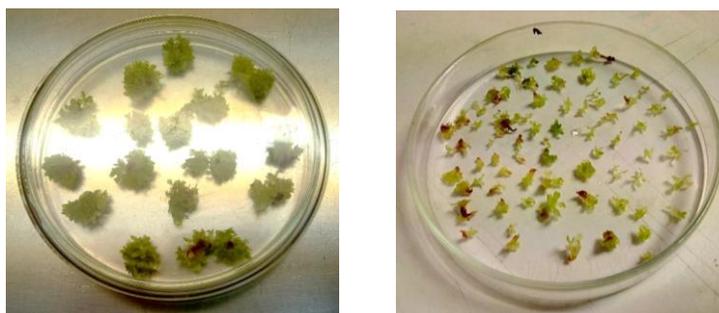


Figura 17. Bloques de brotes de *P. acuminata*

Luego de siete meses de haber sido cultivadas en medio sólido sin reguladores, permanece una condición de proliferación (Fig. 18) si los brotes no se separan constantemente.



Figura 18. Bloques de brotes de *P. acuminata* luego de siete meses de cultivo sin reguladores en medio sólido.

#### 7.4 Aclimatización

Después de cuatro semanas se registró el 94% de sobrevivencia (64 plantas vivas), el 6% restante no sobrevivió debido a eventos esporádicos de contaminación por hongos (Fig. 19).

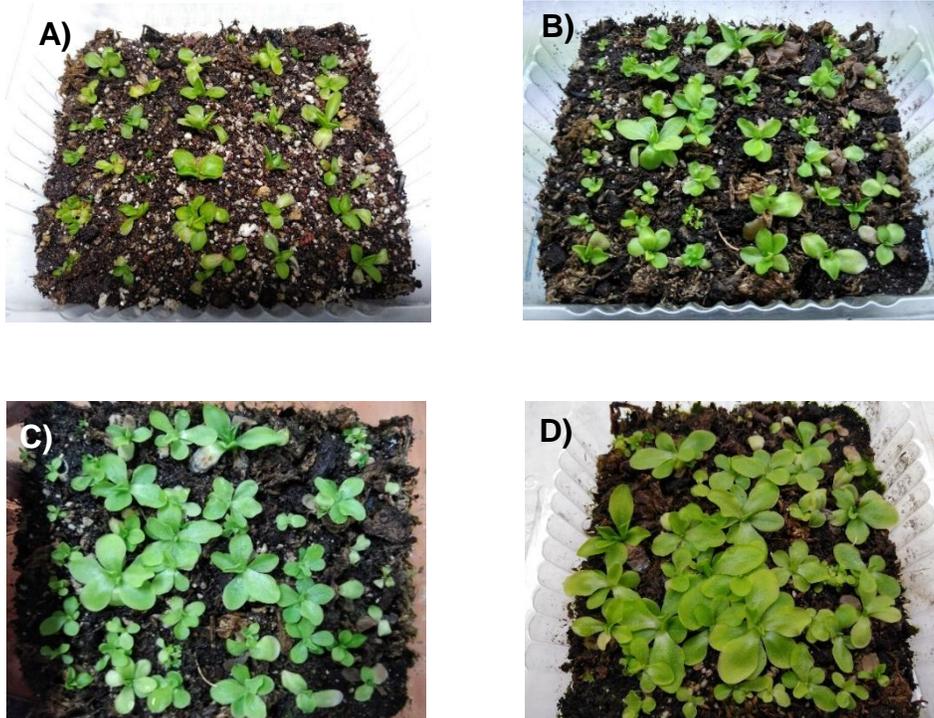


Figura 19. Plantas de *P. acuminata* A) una semana con 0.5-0.8 cm de diámetro, B) dos semanas con 0.8-1.1 cm, C) tres semanas con 1.2-1.5 cm y D) cuatro semanas con 1.2-1.8cm.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Crecimiento *in vitro* en medio líquido y sólido

El medio MS a  $\frac{1}{4}$  de su concentración que se utilizó para propagar *Pinguicula acuminata*, permitió establecer satisfactoriamente tanto en medio sólido como líquido ésta especie sin deficiencias ni alteraciones morfológicas, dicha adecuación ha sido descrita para el desarrollo y crecimiento de plantas insectívoras *in vitro* por la preferencia que tienen a crecer en medios a baja concentración de macronutrientes, ya que está relacionado con la adaptación a sus ambientes naturales, donde sobreviven en suelos con escasos nutrientes (Grevenstuk y Romano, 2012, Gonçalves *et al.* 2008, Legendre, 2000).

En la propagación en medio líquido, Szabados *et al.* (1991) mencionan que para un cultivo de suspensión de células, se debe realizar una selección previa en medio sólido de aquellas colonias friables (fácilmente separables) y que tengan un rápido crecimiento y continua división. En este trabajo se realizó la previa selección de aquellas colonias en las que se observaron las características mencionadas creciendo en medio sólido, sólo que para el caso de *P. acuminata* se obtuvo un bajo porcentaje de callo (cerca del 20%), pero un alto número de brotes, a pesar de que se usó el mismo tratamiento (T7) y condiciones ambientales que el trabajo realizado por Pérez *et al.* (2017), donde obtuvieron 100% de inducción de callo friable para *Pinguicula moranensis*; ni en el T11 propuesto por Kanjana *et al.* (2011), incluso las plantas presentaron un lento desarrollo y posteriormente necrosis a las dos semanas de cultivo.

Albany *et al.* (2015) mencionan que no existen evidencias para hacer comparaciones apropiadas en cuanto a los cultivos en medio líquido y medio sólido, pero a ellos, les resultó más eficiente y estadísticamente superior su cultivo de *Aloe* en medio líquido que en sólido. En este sentido, Mbiyu *et al.*, (2011), Nur *et al.*, (2016) han coincidido que el medio líquido proporciona los mejores parámetros en términos de crecimiento *in vitro*: induce un incremento en la formación de raíces, nodos, hojas y peso que el que pudiera ser obtenido en medio sólido; lo que fué

demostrado con el cultivo en medio líquido de *P. acuminata* (T50), donde se obtuvo un incremento promedio de 41g de peso fresco luego 60 días de cultivo, mientras que en el mismo medio pero sólido, se obtuvo un incremento promedio de 6.3 g de peso fresco al cabo de 60 días. Además es más económico usar medios líquidos que medios sólidos para micropropagación *in vitro*.

Estos resultados parecen estar relacionados con la facilidad que tienen los tejidos de absorber agua y nutrientes de los medios líquidos y como mencionan (Pierik, 1997, Lorenzo *et al.*, p. 197-200 1998, citado por Albany *et al.* 2015) manifiestan crecimiento en poco tiempo, así como favorecen la aireación de los tejidos en contacto con el medio y favorece la dilución de compuestos fenólicos liberados durante el desarrollo; mientras que los medios de cultivo sólidos limitan la absorción de los nutrientes, ya que éstos pasan a formar parte de la matriz del gel, y los explantes requieren mayor tiempo para su crecimiento.

Sin embargo, las plantas creciendo en medios líquidos o en un medio con baja concentración del agente gelificante sufren de hiperhidricidad (también llamado vitrificación), fenómeno fisiológico que se observó en este trabajo bajo cultivo en MS  $\frac{1}{4}$  en el T50 al cabo de 30 días. Kevers *et al.*, 2003, informó que la hiperhidricidad se asocia con varias desviaciones bioquímicas, entre otras, el metabolismo fenólico, asociado con la defensa contra la deshidratación y ataque de patógenos.

Esta condición de hiperhidricidad es considerada reversible, pues ha sido reportado que al transferir el tejido vitrificado a un medio sin condiciones vitrificantes, éste puede retomar las condiciones de las plantas normales (Kevers *et al.*, 2003, Pérez *et al.*, 2017). En este trabajo se logró desvitrificar y generar raíz de manera espontánea en los brotes provenientes del medio líquido, sembrándolos en medio MS  $\frac{1}{4}$  adicionado con  $30 \text{ g L}^{-1}$  de Sacarosa,  $7 \text{ g L}^{-1}$  de agar y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Tiamina, pH 5.7, luego de 8 semanas.

## 8.2 Oxidación *in vitro* en medio líquido y sólido

En el tratamiento líquido T50 se presentó oxidación media (según Figura 4, Córdova *et al.* 2014) desde el día 15 hasta el día 30, que fue disminuyendo hasta llegar al día 70, ésta respuesta puede estar relacionada con lo descrito por Quiala *et al.*, (2011), donde menciona que se han encontrado bajos niveles fenólicos en tejidos hiperhidratados, en contraste con tejidos no hiperhidratados; lo que se observó fue una disminución de la oxidación en este tratamiento.

En el tratamiento líquido T25 se presentó oxidación severa, pasados los sesenta días de cultivo ya no fue posible recuperar los brotes producidos, la oxidación terminó necrosando desde la base del brote hasta su ápice.

## 8.3 Efecto de los reguladores de crecimiento

Empleado en el medio la combinación de la auxina ácido  $\alpha$ -naftalenacético y la citocinina 6-Bencil aminopurina en proporción 1:1, permitió que las células pasaran a un estado indiferenciado (Krikorian 1995; Pérez *et al.*, 2017), dando como resultado pequeños callos y gran cantidad de brotes en constante división, lo que determinó la cantidad de tejido desarrollado en peso fresco a partir del explante. La acción sinérgica de ambos reguladores fue esencial para la obtención de estos resultados (Haré y Staden 1997, Mironov *et al.*, 1999, Frank y Schmölling 1999).

Los nuevos brotes producidos transferidos del medio líquido al medio sólido sin reguladores, puede deberse a otro factor, Legendre (2000) y Studnicka (1991), mencionan que el desarrollo de brotes en la base de las hojas es común, no sólo en hojas cultivadas *in vitro*, si no que forma parte de la propia reproducción asexual del género *Pinguicula*, ya que algunas especies mexicanas producen hojas suculentas durante los meses de invierno, que se pueden desprender fácilmente de la planta y formar nuevos individuos. También estimulado por las hormonas endógenas de la planta.

No obstante, no siempre los reguladores de crecimiento tienen el mismo efecto en todas las especies. Como lo demostró Perica y Berljack (1996) con la adición de

reguladores de crecimiento como ANA sola o en combinación con otros reguladores, los brotes de *Drosera spathulata* produjeron raíces muy gruesas y sólo la mitad de las plantas les regeneraba brotes a las seis semanas de cultivo. En contraste cuando se resembraron en medio MS sin reguladores, se producía brotes adventicios después del desarrollo de la raíz. También mencionan que el crecimiento de las plantas se ve fuertemente afectado por el pH, siendo que el mayor diámetro obtenido fue cuando ajustaron el medio a pH 4.

#### **8.4 Proliferación**

Los siguientes autores sólo trabajaron con medio sólido. Para el caso de *P. acuminata* en el T50 se obtuvo un incremento promedio de 41g de peso fresco (74 veces más tejido) luego de 8 semanas y media en cultivo líquido. Muy superior a lo reportado por Clapa *et al.* (2010), donde menciona que después de doce semanas de cultivo obtuvieron el mayor número de explantes de hoja de *Pinguicula vulgaris* (97.44%). Gonçalves *et al.* (2008) obtuvieron 29 veces más tejido de *Pinguicula lusitánica* luego de 8 semanas de cultivo. Kanjana *et al.* (2011) después de ocho semanas de cultivo obtuvieron el mayor número de plántulas (21.75 brotes) con *Pinguicula gigantea*. Pérez *et al.* (2017) con *Pinguicula moranensis* obtuvieron 1957  $\pm$ 125 brotes, sin embargo en este trabajo se obtuvieron resultados similares (1248  $\pm$  5.96 brotes) una vez que se transfirió a medio sólido sin reguladores luego de 8 semanas de cultivo.

### **9. CONCLUSIONES**

Hasta el momento sólo había sido reportado el cultivo de tejidos vegetales de diferentes especies del género *Pinguicula* en medio sólido, pero en este trabajo se evidenció el potencial de proliferación mediante la propagación de *P. acuminata* en medio líquido.

La combinación adecuada entre auxina y citocinina que permitió regular la organogénesis y desdiferenciación para obtener un gran número de plántulas fue 0.5 mg L<sup>-1</sup>, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA y BAP respectivamente y a los sesenta días de cultivo en medio líquido, se obtiene el mejor promedio de reproducibilidad en el T50.

En medio MS  $\frac{1}{4}$  adicionado con 30 g  $L^{-1}$  de Sacarosa, 7 g  $L^{-1}$  de agar y 1 mg  $L^{-1}$  de Tiamina, pH 5.7, se logró además de desvitrificar las plantas obtenidas del medio líquido, regenerar raíz y obtener plantas independientes, cuando alcanzaron una longitud de 2 - 4 cm, se transfirieron un total de 68 plantas a un blíster de plástico con peatmoss – agrolita 1:1 esterilizado, teniendo un total de 64 plantas sobrevivientes.

A partir del T50, es posible obtener una gran cantidad de biomasa para diferentes fines ya sea de investigación o comercialización de *Pinguicula acuminata*.

## 10. Literatura citada

- Alcalá, E. R. 2011. Darwin, los pinzones y las plantas carnívoras. Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación. Inventio. 77 pp.
- Albany, N. R., Vilchez, P. J. A., Sierralta, S. R., Nava, F. A. R., Martínez, F. L. J. y Molina, P. M. A. 2015. Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill). Revista Colombiana de Biotecnología. 17(1): 24-31
- Alvarado. J., Vázquez. H., Delgado. E. G., Trevisan. D., Horna. O., Pereira. J. y Rojas. C. 2010. Actividad inhibitoria de plantas *in vitro* de *Drosera capillaris* sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Revista Peruana de Biología. 17(3): 353 – 358.
- Banti, V., Giuntoli, B., Gonzali, S., Loreti, E., Magneshi, L., Novi, G., Paparelli, E., Parlanti, S., Pucciarriello, C., Santaniello, A. y Perata, P. 2013. Low Oxygen Response Mechanisms in Green Organisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 4734-4761.
- Brewer, S. J., Baker, D. J., Nero, A. S., Patterson A., Roberts, R. S. y Turner, L. M. 2011. Carnivory in plants as a beneficial trait in wetlands. *Aquatic Botany* 94: 62-70.
- Clapa. D., Fira. A. y Pacurar. I. 2010. *In Vitro* propagation of *Pinguicula vulgaris*. Bulletin UASVM Horticulture, 67(1).

- Córdova, A. M., Cobos, M., Imán, S. A. y Castro, J. C. 2014. Un método eficiente para la inducción de callos in vitro en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria*. 5: 25 - 34
- Evans, D. E., Coleman, J. O. y Kears, A. 2003. *Plant Cell Culture*. Scientific Publishers. USA. 194pp.
- Faccini, D. y Puricelli, E. 2007. Efficacy of herbicide dose and plant growth stage on weeds present in fallow ground. *Agriscientia*. 14 (1): 29-35
- Frank, M., Schmulling, T. 1999. Cytokinin cycles cells. *Trends Plant Sci*. 4: 243-244
- Frías, A. A., Ortiz, M. J. G., De la Cruz, G. G., Torres, Z. Ma. M., Trujillo, H. A., Mandujano, P. M., Aguilar, A. I., Perales, V. H. V., Herrera, R. D., Aguirre, L. E. 2011. *Morfofisiología vegetal, Un acercamiento práctico*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 88pp.
- George, E. F. y Sherington, D. P. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetics. England. 109p.
- George, E., Hall, M. y Klerk, G. 2008. *Plant propagation by tissue culture. The background*. Springer. Netherlands. 1(3): 34-36
- Gonçalves, S., Escapa, A. L., Grevenstuk, T. y Romano, A. 2008. An efficient in viro propagation protocol for *Pinguicula lusitánica*, a rare insectivorous plant. *Springer Science*. 95: 239-243
- González Morales, A. D., Campos Ángeles, G. V., Hernández Santiago, E., Velasco Velasco, V. A y Enríquez del Valle, J. R. 2015. *Lentibulariaceae y los servicios ecoturísticos en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México*. *Tlamati*. 6(4): 37-43.
- Grevenstuk, T. y Romano, A. 2012. *In vitro* plantlet production of the endangered *Pinguicula vulgaris*. *Central European Journal of Biology*. 7(1): 48-53
- Gutiérrez de la Rosa. A. 2005. *Plantas insectívoras mexicanas: el género Pinguicula*. *Sociedad Mexicana de Cactología*. 3(1): 3-5.
- Haré, P. D. y Staden, J. V. 1997. The molecular basis of cytokinin action. *Plant Growth Regul*. 23: 41-78.
- Herrera, G. M., Rodríguez, D. A. Ma. y Guerrero, Z. A. 2008. Evaluación del crecimiento, actividad de hemoperoxidasas y remoción de fenantreno de los

- cultivos celulares de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*. Polibotánica 25: 102-119
- Jankiewicz, L. S. y de Espinoza, A. U. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción. Mundi. México. 487pp.
- Kanjana, S., Vasan, S. y Sumay, A. 2011. The effects of BA and NAA on multiplication of Butterwort (*Pinguicula gigantea*) *in vitro*. Journal of Agricultural Technology 7(5): 1349-1354.
- Kevers, C., Franck, T., Strasser, R. J., Dommès, J. y Gaspar, T. 2003. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 181–191.
- Krikorian, A. D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. Physiology, biochemistry and molecular biology. P. J. Davies. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 774p.
- Legendre, L. 2000. The genus *Pinguicula* L. (Lentiburaceae): an overview. Acta Botánica Gallica 147(1):77-95.
- Martínez, D. M., Hernández, R. C. A. y Restrepo, B. L. F. 2007. Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) fase I. Revista Colombiana de Biotecnología 9 (2): 45-55.
- Mbiyu, M., Muthoni, J., Kabira, J., Muchira, C., Pwaiswai, P., Ngaruiya, J., Onditi, J., y Otieno, S. 2011. Comparing Liquid and Solid Media on the Growth of Plantlets from Three Kenyan Potato Cultivars. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(1): 81-89.
- Merkle, S. A., Parrott, W. A. y Williams, E. G. 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier. Amsterdam. 67-101.
- Mironov, V., Veylder, L. D. y Montagu, M. V. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants the nexus. Plant cell. 11: 509-521.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.

- Nur, I. R., Norrizah, J. S., Azani, S., Nurul, I. O., y Nurul, A. M. A. 2016. The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on in vitro growth of *Typhonium flagelliforme*. *Asian Pac Journal Trop Biomed.* 7(2): 151–156.
- Olvera, M. y Martínez. E. 2002. Primer registro de *Genlisea* (Lentibulariaceae) para México. *Acta Botánica Mexicana* 55:71-73.
- Pedersen, O., Perata, P. y Voesecek, J. L. A. C. 2017. Flooding and low oxygen responses in plants. *Functional Plant Biology.* 44: 3-6.
- Pérez-S. J., Reyero, S. R., Pozos, R. Y., Verastegui, V. M. y Ortiz, M. J. G. 2016. Cultivo *in vitro* de tres especies del género *Pinguicula* para su potencial aplicación ornamental. *Biológico Agropecuaria.* 6(1): 127-134.
- Pérez-S. J., Reyero, S. R., Pozos, R. Y., Verastegui, V. M. y Ortiz, M. J. G. 2017. Propagación *in vitro* de *Pinguicula moranensis* H.B.K., var. Neovolcánica. *Z. Bio Ciencias* 4 (3): 179-188.
- Perica. M. C. y Berljak. J. 1996. In vitro growth and regeneration of *Drosera spatulata* Labill. On various media, *Hort Science* 31 (6): 1033-1034.
- Pierik, R. L. M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands. Pp: 21-146.
- Quiala, E., Cañal, M. J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., Feria, M. y Barbón, R. 2011. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 109: 223–234.
- Rivadavia, F., Read, L. E., y Fleishmann. A. 2017. *Pinguicula pygmea* (Lentibulariaceae), a new annual gypsicolous species from Oaxaca state, México. *Phytotaxa.* 292 (3): 279-286.
- Sánchez Cuevas, M. C. y Salaverría, J. L. 2004. Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria Xananasa* Dutch). *UDO Agrícola.* 4 (1): 21-26
- Slack, A. C. y J. Gate. 1980. Carnivorous plants. MIT Press. Great Britain. 240pp.
- Studnicka, M. 1991. Interesting succulent features in the *Pinguicula* from the Mexican evolutionary center. *Folia Geobot. Phytotax.* 26: 459-462.

- Szabados, L., Mroginski, L.A. y Roca, W. M. 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 969p.
- Villaseñor, J.L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 75: 105-135.
- Visser, W, E. J., Voeselek, J, L. A. C., Vartapetian, B, B. y Jackson, B. M., 2003. Flooding and Plant Growth. Annals of Botany. 91: 107-109.
- Zamora, R. 2002. Importancia de la heterogeneidad ambiental en la ecología de plantas carnívoras mediterráneas: implicaciones para la conservación. Revista Chilena de Historia Natural. 75: 17–26.
- Zamudio, S., Juárez, G. H. D. y Hernández, R. J. 2018. Cuatro especies nuevas de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de México. Phytoneuron 14: 1-20.
- Zamudio, S. y Olvera. M. 2009. A new species of *Utricularia* (Lentibulariaceae) from Guerrero, México. Brittonia 61 (2): 119-125.
- Zamudio, S. y Ortega, R. Z. 1994. Una nueva especie de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de los estados de Querétaro e Hidalgo, México. Acta Botánica Mexicana 28: 57-62
- Zamudio, S. 1999. Notas sobre la identidad de *Pinguicula moranensis* H.B.K., con la descripción de una variedad nueva. Acta Botánica Mexicana 49: 23-34.
- Zamudio, S. 2005a. Lentibulariaceae. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Instituto de ecología, A. C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. 136. 66 pp.
- Zamudio, S. 2005b. Dos especies nuevas de *Pinguicula* (Lentibulariaceae) de la Sierra Madre Oriental, México. Acta Botánica Mexicana 70: 69-83.

## ANEXO

Tabla 1. Tratamientos a evaluar en plántulas de *Pinguicula acuminata*, en combinación de BAP con ANA ó 2,4 D indicados con \*.

Tratamientos MS 1/4	Reguladores de crecimiento ( $\text{mg L}^{-1}$ )			
	BAP	ANA	BAP*	2,4 D*
1, 12*	0	0.5	0	0.1
2, 13*	0	1	0	0.2
3, 14*	0	2	0	0.5
4, 15*	0.2	0.5	0.2	0.1
5, 16*	0.2	1	0.2	0.2
6, 17*	0.2	2	0.2	0.5
7, 18*	0.5	0.5	0.5	0.1
8, 19*	0.5	1	0.5	0.2
9, 20*	0.5	2	0.5	0.5
10	1	2	1	
11	2	5	2	

Todos los medios contienen como parte orgánica: Inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), Tiamina ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), agar ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ) y pH 5.7